

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01395

研究課題名(和文) Egg-in-Cubeプラットフォーム：3次元血管誘導と力学刺激応答試験への応用

研究課題名(英文) Egg-in-Cube: 3D shaping of blood vessels of chick embryo using functionalized artificial eggshell

研究代表者

川原 知洋 (Kawahara, Tomohiro)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号：20575162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、透明人工殻でニワトリ胚を長期培養しながら自在な観察・操作を行うことができる生体プラットフォーム(Egg-in-Cube)について、人工殻表面に構造体を付加して2次元的に部分血管誘導を行う技術を発展させ、3次元的に血管誘導を行う方法論の確立を試みた。結果的に、人工殻表面に付加する構造体(四角形状のシリコンチューブ)の作製や、人工殻への統合方法を確立したことで、高い確率で血管の部分誘導を達成した。また、誘導した血管に対して観察や操作を加えるための周辺技術開発も行い、部分誘導した血管の力学刺激応答計測への応用可能性についても探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、血管形成を3次元のかつ局所的な空間に誘導する学理に関する1つの方法論を構築できた。今後は、より複雑な形状を有する構造体を用いた誘導や複数血管の並列誘導への応用が考えられる。また、3次元的に部分誘導した血管には局所的な力学刺激が可能であるため、刺激前後の血管壁の細胞や血球の応答・形態変化について実際の循環器を用いた試験が可能である。本研究では、微細な血管内に微粒子を打ち込む技術や血管の様子を長時間にわたって観察可能な技術等についても開発を進めることができた。したがって、今後はこれらの技術を統合することで、薬剤試験や微細手術トレーニングなどへの幅広い展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel biomedical platform which consists of a cubic artificial eggshell containing a chick embryo. In addition, we have established a methodology to induce blood vessels to the desired position of the eggshell by assembling the channels and the chambers on the surface of the eggshell. In this project, we developed a 3D blood vessel shaping by applying the blood vessel induction technique which is mainly based on a self-pumping mechanism of chick embryo. Our approach (spatially-arranged blood vessels) is a powerful tool for biomedical research, which afford exciting applications in studies involved in mechanical local stimulation of blood vessels with actual cardiovascular system.

研究分野：バイオ医療ロボティクス

キーワード：生体シミュレータ ニワトリ胚 機能性人工殻 血管誘導 力学刺激応答計測

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

創薬や再生医療など、先進医療を進展させるには生体を用いた試験が最も効果的であり必要不可欠である。しかしながら、世界的に動物実験への倫理規定が厳格化されており生体実験が難しくなっている。これに対し、生体機能の一部を小動物(ゼブラフィッシュやアフリカツメガエル等)の初期胚で模擬する代替法が盛んに研究されている(Seabra et al., *In Vivo*, 2010)。

その中でも、本研究ではニワトリ胚(卵)に着目している。動物実験実施の際の制約が比較的小さく(微生物や無脊椎動物と同じカテゴリーに分類される)、卵黄で成長するため培養液等の栄養供給を必要としない。このような利点を活かし、図1のように胚表面の漿尿膜上にヒトがん細胞を培養し、抗がん剤や腫瘍転移を評価する実験手法が提案されている(Liu et al., *Trans. Oncol.*, 2013 など)。一方で、卵殻によって胚を自由に観察・操作できない大きな問題がある。

以上のような背景を踏まえ、我々は機械工学的な観点から、図2のような透明人工殻を設計・製作し、ニワトリ胚を長期培養しながら自在な観察・操作を行うことができる技術を独自に開発した[*PLoS ONE* 2015]。また、図3のように人工殻表面にチャネルを付加すると、胚の漿尿膜上に形成される血管網を自律的かつ部分的に誘導できるという新しい知見を得た(胚の自己ポンピング現象の発見、図4)[*μ-TAS Conference 2017, PLoS ONE* 2017]。さらに、この現象の主要因を明らかにして人工殻設計に応用し、図5のように複数チャネルへ血管網を同時誘導し、薬剤や細胞を用いた試験が局所的かつ効率的に実施できることを示した[*PLoS ONE* 2017]。

2. 研究の目的

以上の点を踏まえ、本研究では、2次元的に血管網を誘導する技術をさらに発展させ、3次元血管誘導技術を新たに確立するとともに、その学理を実験的及び解析的に明らかにすることを目的としている。さらに、部分誘導した血管に対して様々な力学刺激を加えることで、その際の血管や血球の力学刺激応答を詳細に調査する応用可能性についても探索する。

3. 研究の方法

- (1) **血管を3次元的に誘導する設計論の確立**：従来研究において、原理的には3次元的な誘導が可能であることが確認できているものの、自身が先に吸引されて圧力変化の効果が得られなくなるといった問題により成功率が低く、誘導される血管の長さにも大きなバラツキがある。また、市販の円筒形状のチューブでは観察像が屈折してしまい、誘導した血管や血球の鮮明な観察ができない。そこで、寸法精度と観察性の高い、四角形状のチャネルを新たに開発する。この際、チャネルの幾何学パラメータ及び、チャネル内の表面条件を様々に変更したものを作製し、血管を誘導するための適切な設計条件を明らかにする。また、人工殻にチャネルを効果的にアセンブリする方法についても検討する。
- (2) **実験と解析による誘導メカニズムの解明**：胚を培養しながら、血管形成の様子や人工殻内外の圧力変化を経時的に計測する。このために、窓付きのインキュベータに人工殻を設置してタイムラプス撮影する。また、得られた実験データと数値シミュレーションを組み合わせる解析を行う。最終的には、血管網誘導の主要因となるパラメータを特定し、血管誘導が生じる詳細なメカニズムを明らかにする。
- (3) **誘導した血管の力学刺激と評価**：生体内における組織形成の機序解明に向けて、従来はニワトリ胚を用いて力学刺激による血管形成変化等の調査が行われているが(Riehl et al., *Tissue Eng*, 2014)、胚全体に対して伸展刺激を加える方法に限定されていた。そこで、本研究では3次元的に部分誘導した血管のみに刺激を加える方法を開発する。さらに、胚本体の太い血管から微粒子や薬剤を注入するような技術開発についても試みる。また、発光たんぱく質を生成して細胞の蛍光観察ができる遺伝子組み換えウズラ胚等への応用についても検討を行う。このような試みにより、細胞への局所的な力学刺激とその際の細胞応答を計測できるようにする。

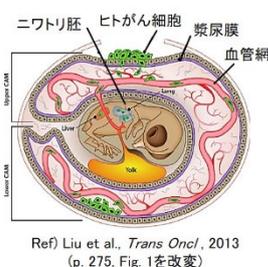


図1：従来研究の例



図2：透明人工殻の外観

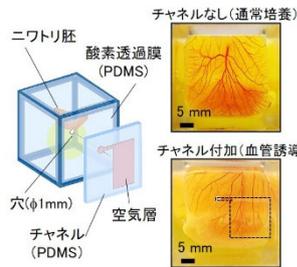


図3：血管誘導機能の付加

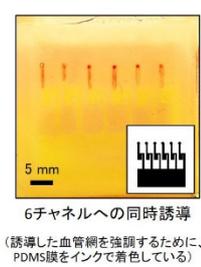


図5：応用例

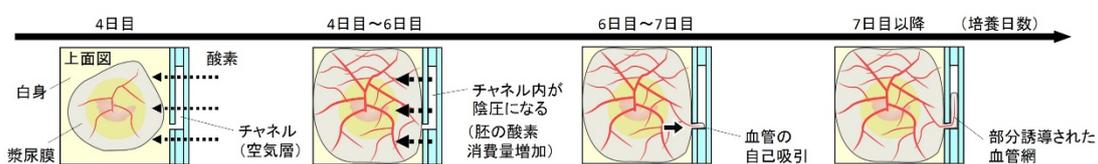


図4：胚の自己ポンピングを利用した血管誘導 (外部動力や血管誘導因子は一切用いない)

4. 研究成果

(1) 血管を3次元的に誘導する設計論の確立に関して

- ① **誘導における問題点**：まず，図6に示すように従来開発した2次元的に血管誘導を行う方法を応用して，筒状の構造体（市販のシリコンチューブ）を人工殻に取り付けた，3次元血管誘導用の人工殻を作製した．また，実際にニワトリ胚を移植して実験を行った．この際，血管誘導が行われることが確認できたものの，その誘導成功率（胚を移植して培養継続した際に，チューブ内に血管が誘導されたもの）は20~30%程度であり，2次元誘導（80%以上）と比較すると著しく結果が悪かった．そこで，研究成果4-(2)-②でも述べるようなタイムラプス観察システムを構築し，血管形成の様子を連続的に観察できるようにした．結果として，図6（右側）に示すように自身が先に空気層内に入ってしまったたり，血管が誘導のための穴を通り過ぎてしまうというような，ポンピング効果が適切に発揮できない問題に起因していることが確認できた．また，誘導されたチューブは円形断面であったため，誘導した際の内部の血球の流れなどが明確に観察できないことが確認できた．
- ② **四角形状チューブの作製**：以上の問題点を踏まえ，シリコンを用いて透明かつ四角形状のチューブの開発を行った．数ミリ角のチューブは市販されていなかったため，鋳型に透明シリコンゴム（PDMS）を流し込んで成型する方法により自作した．図7に作製プロセスと作製した実際のチューブ外観を示す．これにより，外形が2×2 mm（内形1×1 mm）で長さが100 mm程度のチューブを安定的に作成できるようになった．また，図7（右側）のように溶液や微粒子を流して観察性が大幅に向上したことを確認した．
- ③ **アセンブリ方法の改善**：上記の研究成果4-(2)-①と②の結果及び，研究成果4-(2)-①でも述べる予備実験の結果から，血管誘導率や誘導長は，人工殻の組み立てや，チューブ取り付けの組み立て誤差の影響を大きく受けることが分かった．そこで，3層構造になっている人工殻のアセンブリ（組み立て）工程を図8のように大幅に見直した．具体的には，PDMS膜同士を接合する順番や，四角形状チューブを人工殻側面の膜に取り付ける工程を様々に入れ替えて条件出しを行った．加えて，専用器具を開発し，3次元構造体の取り付け精度向上や個体間のバラツキ低減を図った．
- ④ **培養・血管誘導実験**：条件の最適化を行ったうえで作製した人工殻に，3日間予備培養を行ったニワトリ胚を移植して培養を行った．結果として，図9に示すように3次元的な構造体（チューブ）内に血管誘導を行うことができた．この際の誘導成功率は70%以上，誘導長も最大で45mm程度（2次元的な誘導方法と同程度の性能）となり，3次元的な自律誘導の性能を大きく向上させることに成功した．

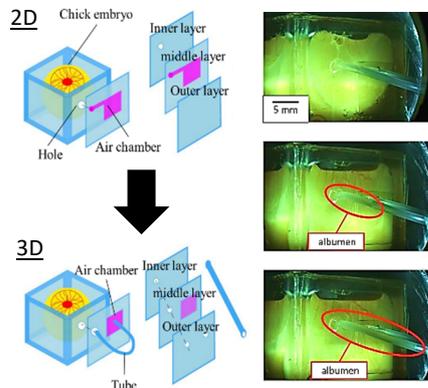


図6：人工殻の基本構造と誘導の問題点

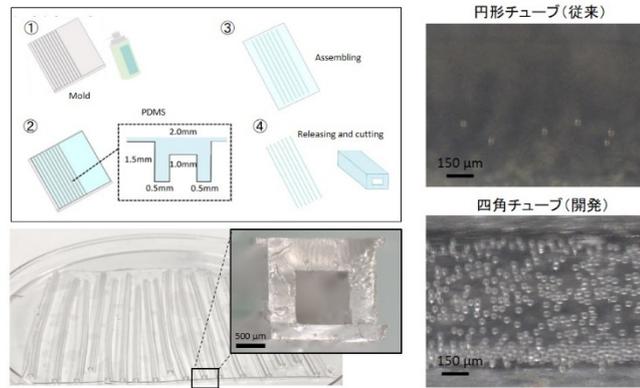


図7：観察性向上のための四角形状チューブの作製と評価

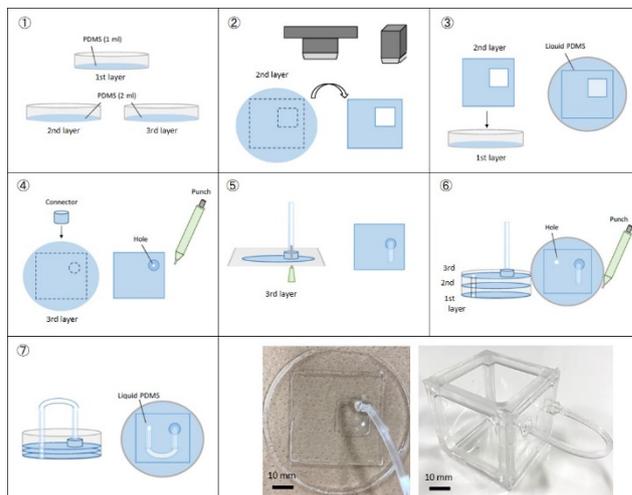


図8：組み立て方式の改善と作製した人工殻

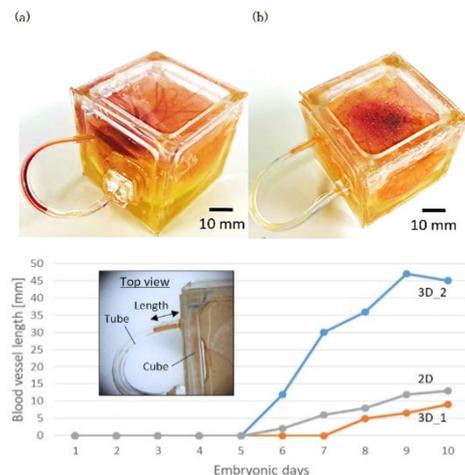


図9：人工殻を用いた3次元的血管誘導の例

(2) 実験と解析による誘導メカニズムの解明に関して

- ① **実験モデルによるデータ計測**：血管が誘導される際、人工殻に付加するチャンネル（流路）の容積や形状がどのように影響しているかを調査するため、図10のような人工殻の実験モデル（インクで着色した液体を用いる）を作成した。これを用いて、圧力センサやカメラを取り付けて外部からポンプで精密に陰圧をかけた際の流路自体の変形や圧力変化について確認を行った。結果として、2次元的方法（従来手法）に対して、3次元的な構造体を付加する場合、ある閾値を超えると圧力が急激に変化して液体がチャンネル内に導入されることが分かった。また、このような特性はチューブの長さや、チャンネルサイズとの相関は小さい反面、チューブ接続部の形状や角度、作製誤差と大きく関係することが分かった。以上の知見を踏まえ、2次元的誘導の際の圧力プロファイルに近くなるように構造体設計や組み立て方法を改良することで、図9で示したように3次元的な構造体においても安定的な血管誘導が行えるようになった。
- ② **タイムラプス観察システムの開発**：血管誘導のための人工殻設計パラメータを探索するために、人工殻に移植したニワトリ胚を培養しながら、連続的かつ視覚的に観察することが重要である。そこで、図11のように培養を行いながら経時観察が可能なシステムを開発した。結果として、血管誘導までの数日間の様子を連続的に撮影し、血管が人工殻内に侵入する様子を捉えることに成功した。これを活用することで、人工殻の設計や組み立ての効率が大幅に向上した。一方で、ロボットシステムと組み合わせることで複数の胚に対して5面からの撮影を行うことができる観察システムについても新たに開発した。これにより、1週間以上に渡って5分間隔で連続的な観察を行い、血管形成の様子や胚が成長を停止する様子の詳細な観測ができるようになった。
- ③ **数値シミュレーションとの統合**：実験で解析が困難な酸素濃度変化や血管形成パターンについて数値解析を試みたが、シミュレーション条件を実験条件と合わせるのが困難であった。今後は、解析範囲を限定するなどの対策により数値解析を培養実験と併用する方法について引き続き検討を行う。

(3) 誘導した血管の力学刺激と評価について

- ① **誘導した血管の観察と操作**：3次元的に誘導した血管について、図12に示すように、顕微鏡下で高倍率観察を行い、力学的な刺激（引っ張り・ねじり）を行いながら、従来よりも鮮明に個々の赤血球の流れを捉えることが可能であることを明らかにした。今後は、刺激を加え続けながら培養を継続する装置を作製して刺激応答計測を試みる。
- ② **インジェクション方法の開発**：刺激方法構築の一環として、薬剤等を血液内に注入する方法についても開発を行った。具体的には、数 μm の微粒子を数100 μm 径の血管に注入するために、遠隔操作型の4軸マニピュレータ、及び、簡易なインジェクションを実施できるパッチ型のデバイスをそれぞれ新たに開発した（図13）。また、これらの方法を用いて血管に微粒子を打ち込むと血液内を微粒子が遊走し、ニワトリ胚内を循環することが確認できた。またこの際の様子を数時間程度に渡って観察できること、及び、誘導した血管内であればより鮮明な観察ができることが分かった。
- ③ **遺伝子組み換え体での実験環境整備**：鳥類胚を観察する場合、どうしても明視野観察では血管壁や血球の確認が難しい場合があった。そこで、発光タンパク質を生成する遺伝子組み換え鳥類の初期胚（卵）を実験室で取り扱うための環境を整備した。また、実際にウズラ胚の血管の3次元的誘導についても5mm程度の誘導が可能であることを確認した。今後も引き続き構造体の最適設計や、誘導長の限界について調査を進める。

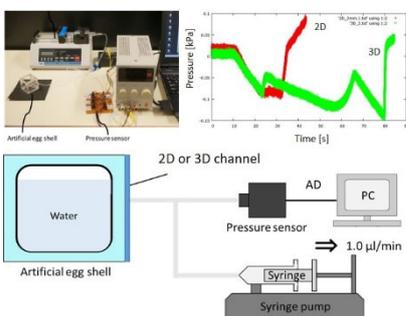


図10：モデル作製と予備実験

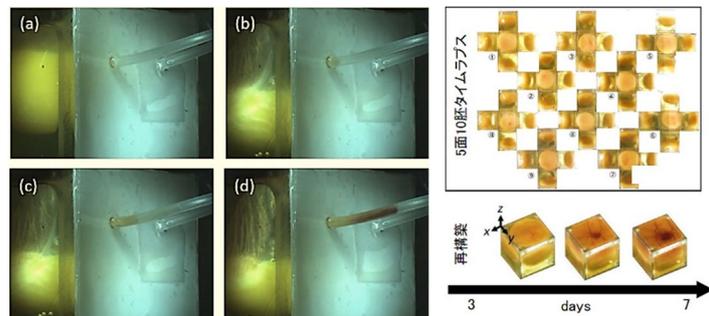


図11：タイムラプス観察の例

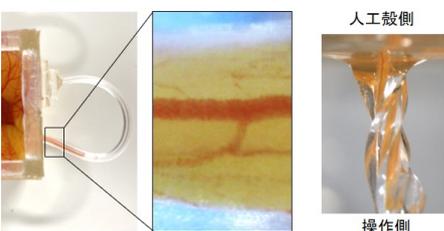


図12：誘導した血管の観察と操作

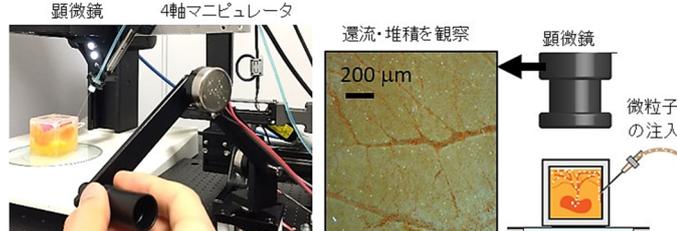


図13：血管への微粒子注入（側面から注入・上面から観察）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wenjing Huang, Sheng Zhang, Belal Ahmad, and Tomohiro Kawahara	4. 巻 9(8)
2. 論文標題 Three-motorized-stage cyclic stretching system for cell monitoring based on chamber local displacement waveforms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 22 pages
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app9081560	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 6件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川原知洋
2. 発表標題 ニワトリ胚を用いたバイオ医療プラットフォームの開発と応用
3. 学会等名 次世代スーパーマイクロサージャリー研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田倫也, 川原知洋
2. 発表標題 透明人工殻内で培養したニワトリ胚微細血管への微粒子注入と観察
3. 学会等名 第42回日本バイオレオロジー学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田倫也, 川原知洋
2. 発表標題 ニワトリ胚微細血管へのマイクロインジェクション技術の開発
3. 学会等名 日本機械学会2019年度年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Kawahara
2. 発表標題 Chick Embryo based Microcirculation Platform for Biomedical Applications
3. 学会等名 16th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川原知洋
2. 発表標題 本物の微小循環器系が利用できるナノロボコン用実験プラットフォーム
3. 学会等名 SICE 分子ロボティクス研究会・JST 分子ロボット倫理研究会合同研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田倫也, 川原知洋
2. 発表標題 Egg-in-Cube: 実際の循環器系を用いることができるバイオ医療プラットフォームの開発
3. 学会等名 第20回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口発至, 川原知洋
2. 発表標題 Egg-in-Cube プラットホームのための全方向タイムラプス観察システムの開発
3. 学会等名 第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田将大, 谷口発至, 川原知洋
2. 発表標題 透明人工殻を用いたニワトリ胚の三次元的血管誘導メカニズムの考察と応用
3. 学会等名 第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川原知洋
2. 発表標題 生体と機械のスマートインテグレーション
3. 学会等名 日本機械学会機素潤滑設計部門「ヒューマン・マシン・インターフェイス設計研究会」, (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川原知洋
2. 発表標題 ロボットで生物を調べる。ロボットに活かす。
3. 学会等名 広島大学大学院工学研究科 システムサイバネティクス特別講義 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohiro Kawahara
2. 発表標題 Microrobotic Platform for Biomedical Applications
3. 学会等名 Translational Imaging Center Seminar at University of Southern California (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川原研究室webページ https://www.lsse.kyutech.ac.jp/~kawahara/ 川原研究室webページ https://www.lsse.kyutech.ac.jp/~kawahara/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 有紀 (Sato Yuki) (90508186)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------